



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 17 994 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:  
**C 08 B 37/06**  
C 07 H 3/06

⑰ Aktenzeichen: 102 17 994.8  
⑱ Anmeldetag: 23. 4. 2002  
④ Offenlegungstag: 6. 11. 2003

**DE 102 17 994 A 1**

⑦ Anmelder:  
Supramol Parenteral Colloids GmbH, 61191  
Rosbach, DE

⑧ Erfinder:  
Sommermeyer, Klaus, Dr., 61191 Rosbach, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤ Konjugate von hypervverzweigten Polysacchariden

⑤ Die bisher als Kopplungsprodukte für parenterale pharmazeutische Wirkstoffe eingesetzten hydrophilen Polymere zur Verringerung von Nebenwirkungen, Erhöhung der Wasserlöslichkeit sowie der Verlängerung der Plasma-Halbwertszeiten sind nicht vollständig metabolisch abbaubar.

Es bestand daher die Aufgabe, solche Verbindungen zu finden, die vollständig abbaubar sind bei gleichzeitig steuerbarer Abbaukinetik.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass vollständig metabolisch abbaubare hypervverzweigte Glucosepolymere aus  $\alpha$ -1-4 glycosidischen linearen Glucoseketten und  $\alpha$ -1-6 glycosidischen Verzweigungseinheiten mit besonders hohen Verzweigungsgraden an Wirkstoffe gekoppelt werden und so deren Eigenschaften vorteilhaft verändern.

**DE 102 17 994 A 1**

[0001] Es ist bekannt, dass durch die Kopplung von hydrophilen Polymeren an Wirkstoffe, die parenteral appliziert werden, d. h. unter Umgehung des Magen-Darm-Traktes verabreicht werden, deren Nebenwirkungen reduziert werden können. Insbesondere können durch die Vergrößerung des Molekulargewichts dieser Wirkstoffe renale Nebenwirkungen reduziert oder sogar vermieden werden, wenn die Molekülgröße der Kopplungsprodukte über der Ausschlussgrenze der Niere, die wie ein Filter wirkt, liegt (Nierenschwelle). Die Molekülgröße des Konjugates wird dabei durch das passend ausgewählte Molekulargewicht des zu konjugierenden Polymers eingestellt.

[0002] Wirkstoffkonjugate mit hydrophilen Oligomeren- oder Polymeren können auch die Antigenizität von therapeutischen Proteinen herabsetzen und so die diesbezüglichen Nebenwirkungen reduzieren oder vermeiden.

[0003] Schließlich lassen sich durch die Konjugation von Wirksubstanzen mit Oligomeren oder Polymeren, die hydrophil sind, die pharmakokinetischen Halbwertszeiten, d. h. die Verweilzeiten der Kopplungsprodukte im Serum von Patienten, erheblich verlängern und so die Therapieintervalle der parenteralen Applikation erheblich ausdehnen. Oligomere oder Polymere Verbindungen, die zur Kopplung geeignet sind, sind vor allem Polyethylenglykole [Herman, S., et. al., Poly(Ethylene Glycol) with Reactive Endgroups: I. Modification of Proteins, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 10, (1995) 145-187] oder auch Stärkederivate bzw. Dextrane, die nach entsprechender Aktivierung an Wirkstoffe gekoppelt werden. Dabei können an sich bekannte chemische Verfahren zum Einsatz kommen, die schon aus der Technik der Immobilisierung von Liganden an Festphasen bekannt sind, oder aus der Chemie der Proteinkopplung bzw. Vernetzung. Entsprechende Verfahren sind beschrieben in G. T. Hermanson et. al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press Inc. (1992) bzw. in S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press LLC (1993) und C. P. Stowell et. al., Neoglycoproteins, the preparation and application of synthetic Glycoproteins, In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 37 (1980), 225-281.

[0004] Insbesondere zu der Technik der Kopplung von Polyethylenglykol an pharmazeutische Wirkstoffe gibt es ein umfangreiches Literaturverzeichnis.

[0005] Während Polyethylenglykole nicht im Körper ohne weiteres metabolisierbar sind, sind Stärkederivate durch die körpereigene Serum- $\alpha$ -Amylase abbaubar.

[0006] Durch geeignete Substitution, z. B. mit Hydroxyethylgruppen kann dieser Abbau gezielt verzögert werden und eine maßgeschneiderte Kinetik der parenteral applizierbaren Wirkstoffkonjugate erreicht werden [K. Sommermeyer et. al., Krankenhauspharmazie, 8. Jahrg. Nr. 8, (1987)].

[0007] Nachteilig an der Derivatisierung mit Hydroxyethylstärke ist jedoch, dass bekanntlich sogenannte Speicherfraktionen existieren [P. Lawin, et. al., Hydroxyethylstärke, Eine aktuelle Übersicht, Georg Thieme Verlag (1989)] die aufgrund der regionalen hohen Substitutionsgrade an bestimmten Stellen der Kohlenhydratkette keinen vollständigen Abbau durch die Körperenzyme mehr zulassen.

[0008] Es bestand daher die Aufgabe, Oligosaccharide bzw. Polysaccharide zur Kopplung an Wirkstoffe zu finden, die vollständig im Körper abbaubar sind und deren Abbau durch die Körperenzyme gleichzeitig gezielt steuerbar sind. Dabei sollen diese Substanzen möglichst vom Körper als physiologisch toleriert werden.

[0009] Überraschenderweise haben wir gefunden, dass hyperververzweigte Amylopektine hierfür besonders gut geeignet sind.

[0010] Sie weisen eine dem körpereigenem Glycogen noch ähnlichere Struktur auf als das Amylopektin, die verzweigte Stärkekomponente, die als Ausgangsprodukt für die Synthese von als Plasmaexpander verwendeter Hydroxyethylstärke eingesetzt wird.

[0011] Durch die sehr hohe Verzweigung sind diese Verbindungen durch die Serum- $\alpha$ -Amylase nur noch langsam abbaubar während z. B. das unsubstituierte Wachsmastärke-Amylopektin innerhalb kürzester Zeit abgebaut wird [Mishler, V., Pharmacology of Hydroxyethylstarch, Oxford University Press, New York, Toronto (1982)] und über die Niere ausgeschieden bzw. metabolisiert wird und somit nicht in Frage käme. Die hochverzweigten Amylopektine sind durch neuere Synthesemethoden gezielt in ihrem Verzweigungsgrad herstellbar (PCT WO 001 8893). Wir haben nun überraschenderweise gefunden, dass eine weitere Derivatisierung durch chemische Gruppen nicht mehr notwendig ist um den  $\alpha$ -Amylase-Abbau soweit zu reduzieren, dass entsprechende Verweilzeiten im Serum erreicht werden. Somit enthält das erfindungsgemäße Polymer ausschließlich durch  $\alpha$ -1-4 und  $\alpha$ -1-6 glycosidische Bindungen verknüpfte Glucose und ist idealerweise dem körpereigenen Glycogen, das ebenfalls nur diese Glucosebindungen aufweist, in höchstem Maße ähnlich. Von diesem unterscheidet es sich letztlich nur noch durch den hohen Anteil der  $\alpha$ -1-4 Verzweigungseinheiten. Der Verzweigungsgrad von Glycogen liegt je nach der Ursprungsquelle zwischen 7 und 11 mol% Verzweigungseinheiten Glucose.

[0012] Die erfindungsgemäßen oli- bzw. polymeren Glucosepolymere können Verzweigungsgrade bis zu 20 Mol% aufweisen, je nach gewünschter Abbaukinetik.

[0013] In ihrem Molekulargewicht können sie ebenfalls der gewünschten pharmakokinetischen Halbwertszeit des Wirkstoffkonjugates angepasst werden.

[0014] Entgegen der von den Stärkefraktionen bekannten Wasser-Schwerlöslichkeit und Retrogradationsneigung, d. h. Neigung zur Assoziation und zu Ausfällungen, sind die hochverzweigten erfindungsgemäßen Polysaccharide gut wasserlöslich, so dass ohne weiteres stabile wässrige Lösungen bis zu 15%igem Anteil an Polysaccharid hergestellt werden können.

[0015] Die Kopplung der Wirkstoffe erfolgt nach an sich bekannten Verfahren, die schon bekannt sind aus der Kopplung von Hydroxyethylstärke-Fractionen oder Stärke-Fractionen an Wirkstoffen. So werden entsprechende Verfahren beschrieben in C. P. Stowell et. al., Neoglycoproteins, the preparation and application of synthetic Glycoproteins, In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 37 (1980), 225-281. Grundsätzlich ist auch in analoger Weise eine Kopplung gemäß den Beschreibungen in G. T. Hermanson et. al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press Inc. (1992) bzw. in S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press LLC (1993), möglich.

[0016] Bevorzugt können die reduzierenden Endgruppen der erfindungsgemäßen Polysaccharide selektive zur Carbonsäure bzw. zu den Carbonsäure-Lactonen oxidiert werden. Die wasserfreien Lactone können dann in trockenem Dimethylsulfoxid analog DE 196 28 705 A1 an freie funktionelle  $\text{NH}_2$  Gruppen von Wirkstoffen in einer amidischen Bindung konjugiert werden.

[0017] Möglich ist auch in wässriger Lösung eine Kopplung des Lactons analog J. Lönngren et. al., Arch. Biochem. Biophys., 175 (1976) 661-669 und C. E. Hayes et. al., J. Biol. Chem., 249 (1974) 1904-1914, welche die Kopplung

von mit Hypojodid zu den entsprechenden Lactonen oxidierten Oligosacchariden an funktionelle  $\text{NH}_2$ -Gruppen von Proteinen beschreiben, die durch ein wasserlösliches Carbo-  
 diimid-Derivat katalysiert wird. Weiterhin können Derivate  
 der erfindungsgemäßen Polysaccharide hergestellt werden  
 mit aliphatischen  $\alpha$ - $\omega$ -Diaminen entsprechend Hashimoto,  
 K., et al., Kunststoffe, Kautschuk, Fasern 9, (1992)  
 1271-1279, die dann vermittels der in der Peptidchemie im  
 Prinzip bekannten Reaktionsfolgen an Carboxylgruppen  
 von Wirkstoffen gekoppelt werden. Solche zuvor eingeführ-  
 ten aliphatischen  $\alpha$ - $\omega$ -Diamine werden auch in der Fachlite-  
 ratur als sogenannte "Linker" bezeichnet. Dabei sind grund-  
 sätzlich sehr viele Varianten an Linker möglich, die an sich  
 alle in der Literatur beschrieben sind. G. T. Hermanson et  
 al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic  
 Press Inc. (1992) bzw. in S. S. Wong, Chemistry of Protein  
 Conjugation and Cross-Linking, CRC Press LLC (1993).

#### Patentansprüche

1. Kopplungsprodukte von chemischen Verbindungen  
 an hypervverzweigte Polysaccharide, dadurch gekenn-  
 zeichnet, dass letztere  
 aus  $\alpha$ -1-4 glycosidisch verknüpften Anhydroglucose-  
 Einheiten mit  $\alpha$ -1-6 glycosidischen Verzweigungs-  
 Anhydroglucose-Einheiten aufgebaut sind,  
 der Verzweigungsgrad zwischen 8 und 25 mol% Glu-  
 cose-Verzweigungseinheiten liegt und  
 das Molekulargewicht zwischen 1.000 und 1.000.000  
 Dalton,
2. Kopplungsprodukte von chemischen Verbindungen  
 an hypervverzweigte Polysaccharide, dadurch gekenn-  
 zeichnet, dass letztere  
 aus  $\alpha$ -1-4 glycosidisch verknüpften Anhydroglucose-  
 Einheiten mit  $\alpha$ -1-6 glycosidischen Verzweigungs-  
 Anhydroglucose-Einheiten aufgebaut sind,  
 der Verzweigungsgrad zwischen 10 und 16 mol% Glu-  
 cose-Verzweigungseinheiten liegt und  
 das Molekulargewicht zwischen 3.000 und 500.000  
 Dalton,
3. Kopplungsprodukte von chemischen Verbindungen  
 an hypervverzweigte Polysaccharide, dadurch gekenn-  
 zeichnet, dass letztere  
 aus glycosidisch verknüpften Anhydroglucose-Einhei-  
 ten mit  $\alpha$ -1-6 glycosidischen Verzweigungs-Anhydro-  
 glucose-Einheiten aufgebaut sind,  
 der Verzweigungsgrad zwischen 10 und 16 mol% Glu-  
 cose-Verzweigungseinheiten liegt und  
 das Molekulargewicht zwischen 4.000 und 250.000  
 Dalton,
4. Kopplungsprodukte nach Anspruch 3, wobei die zu  
 koppelnden chemischen Verbindungen pharmazeuti-  
 sche Wirkstoffe sind,
5. Kopplungsprodukte nach Anspruch 3, wobei die zu  
 koppelnden chemischen Verbindungen bifunktionellen  
 Charakter aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass  
 über die eine funktionelle Gruppe die Bindung zum hy-  
 pervverzweigten Polysaccharid erfolgt und über die  
 zweite funktionelle Gruppe die chemischen Verbindun-  
 gen gekoppelt werden können.